



Espacenet

Bibliographic data: JP 1108976 (A)

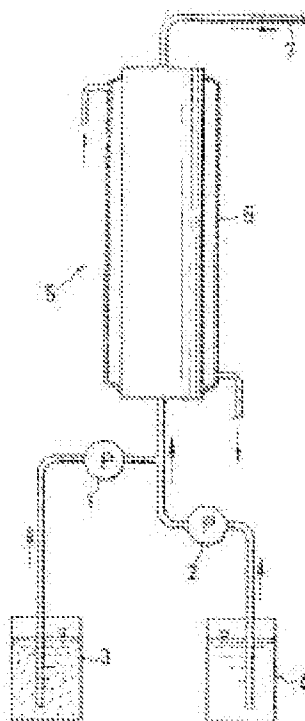
METHOD FOR MIXING LIVING CELL OR MICROBE AND VISCOUS LIQUID

Publication date: 1989-04-26
Inventor(s): RAINHARUTO ROOTERUTO ±
Applicant(s): HOECHST AG ±
Classification:
 - international: *B01F3/14; B01J13/02; C12M1/02; C12M1/33; C12N1/00; C12N1/04; C12N1/20; C12N5/00; C12N5/02; (IPC1-7): B01F3/14; B01J13/02; C12M1/00; C12N1/00; C12N1/20; C12N5/00*
 - European: *C12M1/02; C12N1/04*
Application number: JP19880236656 19880922
Priority number (s): DE19873732370 19870925
Also published as:

- [EP 0308947 \(A2\)](#)
- [EP 0308947 \(A3\)](#)
- [DK 530988 \(A\)](#)
- [DE 3732370 \(A1\)](#)

Abstract not available for
 JP 1108976 (A)
 Abstract of corresponding
 document: EP 0308947
 (A2)

Live cells or microorganisms are mixed
 homogeneously using a static mixer with a viscous
 liquid. Mixtures of this type are suitable, inter alia, for
 microencapsulation of live cells or microorganisms.





Notice

This automatic translation cannot guarantee full intelligibility, completeness and accuracy. [Terms of use.](#)
[Legal notice.](#)

Description EP0308947

Method for mixing of living cells or organisms with a viscous fluid and mixtures were prepared by this method

For certain purposes it may be necessary to living cells or organisms with a viscous liquid to mix homogeneously. Such a purpose is, for example, the microencapsulation of cells or microorganisms. Previously, for preparing such mixtures some special designs using dynamic mixer. The use of dynamic mixers, however, linked with several serious disadvantages, which can lead to inactivation of biological systems. The dynamic mixer, cells and microorganisms are particularly burdened by the shearing forces physically strong. The shear forces increase with the viscosity of each liquid. To keep the load by the agitator within limits, is stirred with a relatively low intensity, which in turn leads to incomplete mixing or relative to a long residence time of the biological systems in a non-physiological environment. Furthermore, it may be necessary in order fully defined and homogeneous mixing of the systems in discontinuous mode - with all the known disadvantages - to work.

In an effort to provide a superior method of mixing of living cells or organisms with a viscous liquid which has now been found that static mixers are ideally suited for this purpose. This is surprising, since it can come from using a static mixer for damage to biological systems, especially through the static mixer in a viscous fluid flows through a pressure drop occurring.

Invention accordingly relates to a method for the homogeneous distribution of living cells or microorganisms in a viscous liquid by mixing the cells or microorganisms living with the viscous liquid, which is characterized in that it uses a static mixer for mixing. The inventive mixing method has the following advantages over the use of dynamic mixer advantages:

- Complete gentle mixing shorter residence times are required (vgl. Beispiel 1)
 - The shear stress on the biological systems is less
 - An energy input of agitators, etc. will not take place
 - The apparatus contains no moving parts, which may require a lubrication and / or sealing
 - An operation in a closed (possibly germ-free) system is easier to achieve.
- With the inventive method, any living cells or microorganisms can be mixed with any viscous liquids. Preferred examples of living cells and microorganisms are known as hybridoma cells, such as antibody-producing cells, plant cells, such as crops, cells, bacteria such as *E. coli* and lactic acid bacteria, Streptomyces, fungi such as *Penicillium* and *Aspergillus* and yeasts such as baker's yeast.

Particularly preferred antibody-producing cells, cells of crop plants, *E. coli* and baker's yeast, in particular antibody-producing cells and cells of crop plants.

The viscous liquid preferably has a viscosity of from about 0.002 to 10 Pa.s, more preferably from about 0.005 to 1 Pa.s, preferably from about 0.01 to 0.6 Pa.s. The mixing of the living cells or microorganisms can with any liquids that do not lead to the destruction of the effected systems. Particular importance has the procedure for the mixing of these biological systems with polymer solutions.

The spatial design of the inventive method suitable for mixing elements is in itself arbitrary is preferable to a spatial design of the mixing elements in the form of a scaffolding of interlocking, intersecting ridges such as a <R> Sulzer SMX static mixer of the Gebrüder Sulzer AG, CH-8401 Winterthur, Switzerland. It can be connected in parallel, any number of mixing elements in common or separate housings. The number of series-connected mixing elements is arbitrary in principle, also to be preferred, however, a number of 1 - 10, more preferably 2-6, especially 4 mixing elements per static mixer.

The speed of flow through the substances to be mixed to the static mixer can be varied over a wide area. Preferable is a flow speed at which - for the conservation of biological systems - which runs substantially laminar flow. This velocity is in turn dependent on the spatial layout and the dimensions of the static mixer.

A device with the method of the invention can be carried out, such as those covered in the figure are schematically illustrated construction. With the pump (1) and (2) are the living cells or microorganisms that are present in vascular supply (3) in a solvent suspension, and the viscous fluid is pumped from storage vessel (4) of the leads in the static mixer. The solvent for suspension is arbitrary, it is preferable to water, if necessary, with additives that are beneficial for the cells or microorganisms, such as dietary supplements, etc. It is useful to the entire system or just the other mixing elements (5) as follows, shown in the figure, provided with a temperature control (6). After flowing through the mixer, the mixture obtained in any manner for further use are supplied.

By the following embodiments, the invention will be explained in more detail.

Examples

Example 1

30 ml of a 3 wt.-% solution of lambda dCarrageen soln (Manufacturers Sigma Chemie GmbH, Munich) is a peristaltic pump to the static mixer with a pump power of 850 mu l / min fed. 30 ml of medium (Dulbecco's medium supplemented with fetal calf serum) is incubated with a pump power of 850 mu l / and fed to a second peristaltic pump to the mixer. The applied static mixer consists of four mixing

elements (SMX mixer DN4 of the company Gebrüder Sützer AG). The suspension thus prepared is in the spectrophotometer at 750 nm, analyzed and tested for homogeneity.

The measured values are comparable with those of other mixed systems, with only about 20 sec residence time in the mixed system compared to several minutes at a dynamic mix.

Example 2

30 ml of a 3 wt.-% solution of lambda carrageenan sol is using a peristaltic pump with a pumping capacity of 850 ml / min fed. 30 ml medium at a cell density of 10^5 cells / ml is the mixer with a second peristaltic pump with a pumping capacity of 850 ml / min fed.

The mixer used is composed of four mixing elements (SMX mixer DN4 of Gebrüder Sützer AG). The suspension thus prepared is dripped through a Vertropfungseinheit to micro-droplets, which are a polybase (copolymer of vinylpyrrolidone and vinyl imidazolium) brought into contact. The resulting capsules contain about 30 cells and are consistent. Microscopic studies and long-term observations show no detectable damage to cells.



Notice

This automatic translation cannot guarantee full intelligibility, completeness and accuracy. [Terms of use.](#)
[Legal notice.](#)

Claims EP0306947

First Procedures for the homogeneous distribution of living cells or microorganisms in a viscous liquid by mixing the cells or microorganisms living with the viscous liquid, characterized in that it uses a static mixer for mixing.

Second The method of claim 1, wherein the viscous fluid has a viscosity of approximately 0.002 to 10 Pa.s, preferably from about 0.005 to 1 Pa.s, preferably from about 0.01 to 0.6 Pa.s has.

Third The method of claim 1 or 2, wherein the viscous fluid is a polymer solution.

4th The method according to any one of claims 1 to 3, wherein the static mixer has 1 to 10, preferably 2 to 6, 4 mixing elements.

5th The method according to any one of claims 1 to 4, wherein the mixing is done in laminar flow.

6th Mixtures of living cells or organisms with a viscous solution, characterized in that the mixture was prepared by a method according to any one of claims 1 to 5.

⑫ 公開特許公報(A)

平1-108976

⑮ Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	⑯ 公開 平成1年(1989)4月26日
C 12 N 1/00		Z-7235-4B	
B 01 F 3/14		6639-4G	
B 01 J 13/02		Z-8317-4G	
C 12 N 1/20		Z-8515-4B	
		Z-8515-4B	
// C 12 M 1/00		J-8717-4B	審査請求 未請求 請求項の数 6 (全4頁)

⑰ 発明の名称 生きた細胞または微生物を粘稠な液体と混合する方法

⑱ 特 願 昭63-236656

⑲ 出 願 昭63(1988)9月22日

優先権主張 ⑳ 1987年9月25日㉑ 西ドイツ(DE)㉒ P 37 32 370.9

⑳ 発 明 者 ラインハルト・ローテ ドイツ連邦共和国デー-6272ニーデルンハウゼン/タウヌ
ルト ス。イートシュタイナーシュトラッセ86

㉑ 出 願 人 ヘキスト・アクチエン ドイツ連邦共和国フランクフルト・アム・マイン(番地な
ゲゼルシャフト し)

㉒ 代 理 人 弁理士 高木 千嘉 外2名

明 細 書

載の方法。

1. 発明の名称 生きた細胞または微生物を粘稠
な液体と混合する方法

5) 混合が層流で行われることからなる請求項
1~4のいずれかに記載の方法。

2. 特許請求の範囲

6) 請求項1~5のいずれかに記載の方法を用
いて製造された、生きた細胞または微生物と
粘稠な液体との混合物。

1) 生きた細胞または微生物を粘稠な液体と混
合することにより粘稠な液体中における生き
た細胞または微生物の均質な分散系を製造す
るに当たり、スタティックミキサーを使用し
て混合することからなる方法。

3. 発明の詳細な説明

ある種の目的にとつて、生きた細胞または微
生物を粘稠な液体と均質に混合することが必要
でありうる。かかる目的には例えば細胞または
微生物のマイクロカプセル化がある。かかる混
合物を製造するにはこれまで特別な設計のダイ
ナミックミキサーが使用されてきた。しかしな
がらダイナミックミキサーの使用は生物学的系
の不活化を招来しうるいくつかの重大な欠点と
関わりがある。ダイナミック攪拌器を使用する
と、特に剪断力が生ずることが原因で細胞およ

2) 粘稠な液体が粘度約0.002~10 Pa.s、好ま
しくは約0.005~1 Pa.s、特に約0.01~0.6 Pa.s
を有することからなる請求項1記載の方法。

3) 粘稠な液体がポリマー溶液であることから
なる請求項1または2記載の方法。

4) スタティックミキサーが1~10個、好ま
しくは2~6個、特に4個の混合部材を有す
ることからなる請求項1~3のいずれかに記

び微生物に物理的に強い応力がかかる。生じた剪断力はそれぞれの液体の粘度が増大するに伴い高まる。攪拌器による応力を限界内に保つには、比較的弱く攪拌するが、またそのことにより混合が不完全になるかまたは生物学的系を非生理学的環境に比較的長時間滞留させることになる。さらに、明確かつ完全に系を均質に混合するにはすべての知られた欠点を伴つたまま不連続操作を行うことが必要なこともありうる。

生きた細胞または微生物を粘稠な液体と混合するための改良された方法を提供しようとする試みから、スタティックミキサーがこの目的に優れて適することが見出された。これは驚くべきことである、なぜならスタティックミキサーが使用される場合は、特に粘稠な液体が流れる際にスタティックミキサー中に圧力低下が生ずるゆえに生物学的な系の損傷が起り得るからで

り容易に達成されうること、である。

本発明による方法を用いて任意の生きた細胞または微生物を任意の粘稠な液体と混合することができる。生きた細胞および微生物の好ましい例をあげれば、

例えば抗体産生性細胞のようなハイブリドーマ細胞、

例えば生産性植物細胞のような植物細胞、

例えば大腸菌および乳酸菌のような細菌細胞、

例えばペニシリウム (*Penicillium*) およびアスペルギルス (*Aspergillus*) のようなストレプトミセス科および菌類、および

例えばパン酵母のような酵母、である。

特に好ましいのは抗体産生性細胞、生産性植物細胞、大腸菌およびパン酵母、特に抗体産生

ある。

それゆえ本発明は生きた細胞または微生物を粘稠な液体と混合することにより粘稠な液体中における生きた細胞または微生物の均質な分散系を製造するに当たり、スタティックミキサーを使用して混合することからなる方法に関する。本発明による混合法はダイナミックミキサーの使用に比較して以下の長所を有する、すなわち

- 低い応力下に完全に混合するのに要する滞留時間が比較的短いこと (実施例 1 参照)、
- 生物学的系に及ぼす剪断応力が低いこと、
- 攪拌器その他によるエネルギーの導入がないこと、
- 場合により潤滑および/またはシールを必要とする可動部分が装置中に含まれないこと、および
- 密閉 (場合により無菌) 系における操作がよ

性細胞および生産性植物細胞である。

粘稠な液体は好ましくは粘度約 0.002~10 Pa.s, 特に好ましくは約 0.005~1 Pa.s, 特に約 0.01~0.6 Pa.s を有する。生きた細胞または微生物はその系の損傷を招来しない任意の所望の液体と混合されうる。この方法は前記した生物学的系をポリマー溶液と混合するのに特に重要である。

本発明による方法に適する混合部材は任意の所望の三次元構造を固有にとることができる。好ましい混合部材の三次元構造は例えばスイス国、CH-8401 Winterthur の Gebrüder Sulzer Aktiengesellschaft 社により供給される^(a) Sulzer SMX スタティックミキサーのような、相互に係合しかつ交叉するウェブの骨組の形態である。任意の所望の数の混合部材を同じハウジングまたは別のハウジングの中に平行して連結すると

とができる。原則的には、同様に任意の所望の数の混合部材が連続して連結されるが、しかしながら好ましい混合部材数は1スタティックミキサー当たり1～10個、特に好ましくは2～6個、特に4個である。

混合すべき物質がスタティックミキサー中を流れる速度は広い範囲にわたり変動されうる。生物学的系に及ぼされる応力を最小限に抑制するために実質的に層流となる流速が好ましい。この速度は三次元構造およびスタティックミキサーの寸法の如何による。

本発明による方法が実施される装置は、例えば図面に概要を示す構成を有しうる。貯留器3中の溶媒懸濁液中に存在する生きた細胞または微生物および貯留器4中の粘稠な液体がポンプ1および2により導入管路を通つてスタティックミキサー5中にポンプ送りされる。懸濁用の

スタティックミキサーは4個の混合部材を有する(Gebrüder Sulzer AG社製、DN4 SMOXミキサー)。かくして調製された懸濁液を分光光度計中750 nmで分析して均質性に関して検査する。

ダイナミックミキサーの場合の数分間に比較してミキサー系中にたつたの約20秒間滞留しただけであるのにこの測定された値は他の混合系で得られた値に匹敵する。

実施例 2

3重量%のλ-カラゲーニン溶液30 mlを蠕動ポンプにより毎分850 μlの送出速度で供給する。細胞10⁵個/mlなる細胞密度を有する培地30 mlを第2の蠕動ポンプを用いて毎分850 μlの送出速度でミキサーに供給する。

用いられたミキサーは4個の混合部材を含有する(Gebrüder Sulzer社のDN4 SMOXミキサー)。かくして調製された懸濁液を滴下ユニットを通

溶媒は任意のものでよく、細胞または微生物にとって好都合な添加物、例えば栄養添加物等の場合により含有する水が好ましい。系全体または混合部材(類)のみが図面に示されるように温度調節装置6を備えていることが重要である。ミキサーに流れたのちに得られる混合物は任意の方法で運搬されて以後の使用に用いられる。

以下の実施例により本発明をより詳しく説明する。

実施例 1

3重量%のλ-カラゲーニン溶液(Sigma Chemie GmbH製、ミュンヘン)30 mlを蠕動ポンプによりスタティックミキサー中に毎分850 μlのポンプ送出速度で供給する。培地(ウシ胎児血清を含有するダルベッコ(Dulbecco's)培地)30 mlをポンプ送出速度毎分850 μlで第2の蠕動ポンプからミキサー中に供給する。用いられ

過させて微小滴となし、これらをポリベース(ビニルイミダゾリウムメトクロライドとビニルピロリドンとの共重合体)と接触させる。生成するカプセルは約30個の細胞を含有しておりそして均一である。顕微鏡による検査ならびに長時間観察では何ら細胞の損傷は検出されない。

4. 図面の簡単な説明

添付図面は本発明に用いられる装置の概略を示す。図中1および2はポンプ、3および4は貯留器、5はスタティックミキサー、そして6は温度調節装置を示す。

特許出願人 ヘキスト・アクチエンゲゼルシャフト

代理人 弁理士 高木 千 嘉

外2名

